

HABILITATIONSSCHRIFT

HANS-CHRISTOPH CURTIUS

HABILITATIONSSCHRIFT
zur Erlangung der venia legendi
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

1972

Sonderdruck

Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie 6. Jahrgang, Heft 3, Mai 1968. S. 122 bis 131
Walter de Gruyter & Co., Berlin 30



Die Gaschromatographie und ihre instrumentellen Kombinationen

Von H.-CH. CURTIUS

Aus der Medizinisch-Chemischen Abteilung der Universitäts-Kinderklinik Zürich (Direktor: Prof. Dr. A. Prader)

(Eingegangen am 2. Februar 1968)

Der heutige Stand der Gaschromatographie, spezieller gaschromatographischer Techniken und die Kombination der Gaschromatographie mit anderen Analysen- und Detektionsverfahren werden eingehend beschrieben.

The present standing of gas chromatography, special gas chromatographic techniques and the combination of gas chromatography with other analytical methods are discussed in detail.

In der biochemischen und klinisch-chemischen Forschung ist es notwendig, immer spezifischere Komponenten in außerordentlich geringer Konzentration zu erfassen. Die diese Forderung am besten erfüllende Chromatographiemethode ist heute ohne Zweifel die Gaschromatographie (GC). Im Gegensatz zu papier- und dünnschichtchromatographischen oder hochspannungselektrophoretischen Verfahren handelt es sich um eine quantitative Chromatographiemethode. Da mit der GC¹⁾ noch Substanzmengen von weniger als 10^{-9} g spezifisch erfaßt werden und die Trennleistung weit über derjenigen aller bisherigen Trennverfahren liegt, können mit Hilfe der GC in der Biochemie und Klinischen Chemie Probleme gelöst werden, die bisher nicht oder nur unbefriedigend bearbeitet werden konnten.

Unter dem Begriff der GC versteht man die Verteilung eines Stoffes zwischen einer beweglichen, gasförmigen

Phase und einer stationären, festen oder flüssigen Phase. Die Anwendbarkeit der GC ist auf Verbindungen beschränkt, die normal verdampft werden können oder sich in reproduzierbarer Weise in stabile, dampfförmige Spaltprodukte zersetzen lassen.

Der große Vorteil der GC besteht in der guten und schnellen Auflösung der chromatographischen Kolonnen, verbunden mit einer hohen Empfindlichkeit der

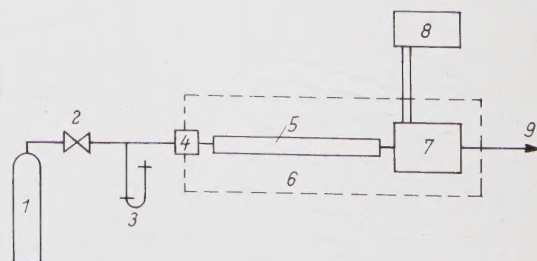


Abb. 1
Schema eines Gaschromatographen

- | | |
|--------------------------|---------------|
| 1 Gasbombe für Trägergas | 6 Ofen |
| 2 Reduzierventil | 7 Detektor |
| 3 Manometer | 8 Schreiber |
| 4 Einspritzblock | 9 Gasaustritt |
| 5 Kolonne | |

¹⁾ Abkürzungen: GC = Gaschromatographie, FID Flammenionisationsdetektor, NMR (nuclear magnetic resonance)-Spektroskopie = Kernresonanzspektroskopie.

Detektoren. Sie gestattet daher eine schnelle und spezifische Analyse von organisch-chemischen Verbindungen im Nanogrammbereich. Obwohl nur äußerst geringe Mengen für die Analyse eingesetzt werden, ist die GC den meisten konventionellen Methoden an Trennfähigkeit und Genauigkeit überlegen. Sie wird daher in Zukunft in der Biochemie und Klinischen Chemie einen wichtigen Platz einnehmen.

Folgende biochemisch und medizinisch interessierende Verbindungsklassen sind für die GC teils in ihrer freien Form, teils als Derivate geeignet: Fettsäuren, Kohlenhydrate, Amine, Alkaloide und Aminosäuren, Gallensäuren, aromatische Säuren im Urin, Steroide, flüchtige organische Anästhetika im Blut. Die GC der meisten hier erwähnten Verbindungsklassen kann als prinzipiell gelöst angesehen werden.

Technische Beschreibung eines Gaschromatographen

Schematisch kann der Gaschromatograph in drei Teile zerlegt werden:

- a) Einspritzblock
- b) Kolonne
- c) Detektor

Der Einspritzblock

Der Einspritzblock dient zur Überführung des Stoffes in die Gasphase und damit zur Einbringung in den Trägergasstrom. Die Substanz muß im Einspritzblock möglichst schnell verdampfen. Die Einspritzblocktemperatur sollte in der Regel etwa 30° über der Kolonnentemperatur liegen.

Schwerflüchtige Verbindungen hohen Molekulargewichts, z. B. Steroide, werden mit Vorteil direkt auf das Kolonnenende aufgespritzt, um so eine schonende Verdampfung zu erreichen. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, daß bei rohen Organextrakten unverdampfbare Rückstände am Kolonnenanfang liegenbleiben und nach kurzer Zeit die Säule unbrauchbar machen. Bei Verwendung eines leicht zu reinigenden Verdampfungsrohres im Einspritzblock können diese Rückstände bequem entfernt werden. Wir konnten in unserem Laboratorium beobachten, daß eine genaue Temperatureinstellung des Einspritzblocks bei schwerflüchtigen Verbindungen sehr wichtig ist.

Die Trennsäule

Man unterscheidet grundsätzlich zwei Arten von gaschromatographischen Trennsäulen: gepackte Säulen und Kapillarsäulen.

Die üblichen *gepackten Säulen* haben meistens eine Länge von 1–3 m und einen Innendurchmesser von 2–8 mm. Die Füllung der gepackten Säule besteht aus einem festen, inerten, meist anorganischen Trägermaterial, wie Kieselgur (Chromosorb), gebrannte Tone, Glas- und Kunststoffpulver, das mit 0,5 bis 40 Gew.-% einer Flüssigkeit, der sogenannten Trennflüssigkeit oder stationären Phase, imprägniert ist. Die Trennflüssigkeit sollte bei der jeweiligen Arbeits-

temperatur einen sehr geringen Dampfdruck besitzen. Bei der GC wirkt sich jede restliche Adsorptionsaktivität störend aus. Sie wird bei Kieselgur und Ton durch erschöpfendes Waschen mit Säuren oder Laugen und anschließend nach scharfem Trocknen durch Umsetzung mit Hexamethyldisilazan oder Dichlordimethylsilan beseitigt.

Die *Kapillarsäulen* haben in der Regel eine Länge von 25–100 m und einen Innendurchmesser von 0,25 bis 1 mm. Zum Unterschied von gepackten Säulen enthalten sie kein Trägermaterial, die Trennflüssigkeit haftet vielmehr als dünner Film auf der Innenwand der Kapillare. Kapillarsäulen zeigen eine wesentlich bessere Trennleistung als gepackte Säulen, sie haben jedoch für biochemische und klinisch-chemische Anwendungen praktisch noch keine Bedeutung gewonnen.

Die Auswahl der geeigneten *Trennflüssigkeit* ist ein entscheidendes Problem der GC. Primär erfolgt auf jeder Säule die Eluierung und damit die Trennung der Komponenten in der Reihenfolge der Dampfdrucke. Darüber hinaus liefert die Wechselwirkung zwischen Trennflüssigkeit und Komponente einen zusätzlichen Beitrag zur Verweilzeit, den man mit der Bezeichnung „Polarität“ oder „Selektivität“ der jeweiligen Trennflüssigkeit charakterisiert.

Bei der Trennflüssigkeit unterscheidet man im wesentlichen polare und unpolare Phasen. Die unpolaren Phasen sind thermostabiler und weisen die kürzeren Retentionszeiten auf; sie reagieren jedoch weniger auf funktionelle Gruppen. Für schwerflüchtige Verbindungen, wie Steroide, bei denen die Retentionszeit möglichst kurz gehalten werden muß, sind unpolare Phasen besser geeignet.

Das Maß für die *Trennleistung* der Säule ist die sogenannte theoretische Bodenzahl (Trennstufenzahl). Ein theoretischer Boden entspricht dem Abschnitt der Säule, in dem eine vollständige Gleichgewichtseinstellung zwischen dem gelösten und gasförmigen Zustand der vom Trägergas transportierten Analysenkomponente erfolgt. Je öfter diese Gleichgewichtseinstellung in einer Säule stattfindet, um so höher ist ihre Trennleistung. Die Höhe eines theoretischen Bodens und damit bei gegebener Säulenlänge die Gesamtzahl der theoretischen Böden läßt sich aus dem Chromatogramm aus dem Verhältnis von Retentionszeit zur Halbwertsbreite des entsprechenden Peaks berechnen. Gepackte Säulen von 2 m Länge haben in der Regel Bodenzahlen von etwa 2500–3000, Kapillarsäulen bis zu 100000.

Das *Säulenmaterial* besteht im allgemeinen aus Metall (Kupfer oder Edelstahl) oder Glas. Die Trennleistung steigt bei sinkendem Säulendurchmesser und zunehmender Säulenlänge, andererseits vergrößern sich aber auch die Retentionswerte der Substanzen.

Als *Trägergase* kommen für biochemische und klinisch-chemische Aufgaben vor allem Stickstoff, Argon und Helium in Frage. Im allgemeinen verwendet man speziell gereinigten Stickstoff (sogenannten Lampenstickstoff). Zur präparativen GC wird Argon empfohlen,

das am Säulenausgang mit flüssiger Luft kondensiert wird. Anschließend läßt man das Gas bei Zimmertemperatur abdampfen, wobei die gewünschte Substanz in der Kühlfalle zurückbleibt.

Die *Arbeitstemperatur* spielt bei der GC eine sehr große Rolle. Man unterscheidet zwischen der *isothermen Gaschromatographie* und der *programmierten Thermo-Gaschromatographie*.

Bei der *Thermo-Gaschromatographie* wird während der Analyse die Temperatur der Trennsäule von einer niederen Anfangstemperatur an erhöht. Erfolgt die Temperaturerhöhung linear, d. h. mit einer konstanten Programmrate pro Zeit, so spricht man von einem linearen Temperaturprogramm. Bei Gemischen mit einem weiten Siedebereich erreicht man damit für alle Komponenten ein Optimum an Auflösung und Analysenzeit im Verlauf einer einzigen Analyse.

Zur Steroid-Gaschromatographie verwendet man im allgemeinen die *isotherme* Arbeitsweise, da bei den hier verwendeten Kolonnen in der Nähe der maximal zulässigen Temperatur gearbeitet wird.

Der Detektor

Unter der Bezeichnung Detektor verstehen wir einen Apparat, der das chromatographische Ergebnis in eine registrierbare Form umwandelt. In Verbindung mit einem Schreiber liefert der Detektor das sogenannte *Gaschromatogramm*.

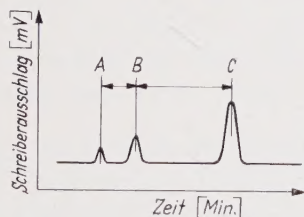


Abb. 2
Gaschromatogramm
A = Start der Analyse
B = Luftbande
C = Substanzbande

Die wichtigsten Detektoren sind:

1. Wärmeleitfähigkeitsdetektor
2. Flammenionisationsdetektor (FID)
3. β -Ionisationsdetektor
4. Elektroneneinfangdetektor (electron capture detector)
5. Phosphordetektor

Für die Biochemie und Klinische Chemie kommen praktisch nur der Flammenionisationsdetektor, der Phosphordetektor und der Elektroneneinfangdetektor in Frage. Auf Grund seiner hohen Empfindlichkeit und seines weiten linearen Bereiches ist der FID der universellste Detektor. Als selektiver Detektor, speziell zum Nachweis halogenhaltiger Verbindungen mit höchster Empfindlichkeit, wird der Elektroneneinfangdetektor, für phosphorhaltige Verbindungen der Phosphordetektor verwendet.

Der Flammenionisationsdetektor

Der Detektor besteht aus einem Mikrobrenner (Wasserstoffflamme) und zwei Elektroden (Polarisationselektrode und Sammelelektrode an den Seiten des Brenners),

an die ein elektrisches Potential angelegt wird. Die durch die Verbrennung entstehenden Ionen werden von der Sammelelektrode eingefangen. Der Ionenstrom wird verstärkt, in Gleichspannung umgewandelt und durch einen Schreiber registriert. Die Menge der von einer Wasserstoffflamme gebildeten Ionen hängt von der Gegenwart flüchtiger Kohlenstoffverbindungen ab. Dieses Phänomen bildet die Basis des FID.

Der FID wurde zuerst von HARLEY, NEL und PRETORIUS und von MCWILLIAM und DEWAR (1) beschrieben. Der Detektor spricht nahezu auf alle organischen Verbindungen an. Die Ionisation ist relativ gering. Von 10^5 Molekülen entsteht etwa 1 Ionenpaar. Praktisch erreicht man mit dem FID im Maximum eine Empfindlichkeit von 10^{-8} bis 10^{-9} g.

Vorteilhaft am FID ist, daß er auf Wasser und andere anorganische Stoffe nicht oder fast nicht anspricht. (Die Ionisation der O—H- und C=O-Bindungen ist wesentlich geringer als diejenige der C—C- und C—H-Bindungen.) Der FID hat eine hohe Linearität (6—8 Zehner-Potenzen).

Der Elektroneneinfangdetektor

Dieser Detektor wurde erstmals von LOVELOCK (2) beschrieben und nicht vor 1960 angewandt. Er hat die besondere Eigenschaft, stoffspezifisch anzuzeigen. In einer Ionisationskammer werden durch radioaktive Bestrahlung Ionen erzeugt; wenn nun mit dem Trägergasstrom eine elektronenabsorbierende Substanz in die Kammer eingeleitet wird, entsteht eine Abnahme der Elektronenkonzentration, die elektrisch gemessen und verstärkt wird. Sie ist proportional zur Konzentration des elektronenabsorbierenden Stoffes und zu seiner Elektroneneinfangfähigkeit und daher stoffspezifisch. Die hier skizzierte Funktion des Elektroneneinfangdetektors ist stark vereinfacht, die Vorgänge sind in Wirklichkeit komplexer.

Im wesentlichen benötigt man für den Elektroneneinfang Halogene. Man kann diese durch die Herstellung von Derivaten in das Molekül einführen. So sind bei den Steroiden Perfluorbutyrate (WOTIZ (3)) und bei den Aminosäuren Trifluoracetate (WEIGAND (4)¹) besonders geeignet. Die Entwicklung ist hier noch im Fluß, doch scheint es möglich, bei den Steroiden $1 \mu\text{g}$ im 24-Stdn.-Urin nachzuweisen.

Pro Signal können noch Mengen von 10^{-10} bis 10^{-11} g nachgewiesen werden. Das Arbeiten mit dem Elektroneneinfangdetektor ist sehr heikel, es darf vor allem kein Wasser in den Detektor gelangen. Die Linearität des Elektroneneinfangdetektors ist schlecht (höchstens 2 Zehner-Potenzen).

An Stelle von Stickstoff kann beim Elektroneneinfangdetektor auch Argon mit 10% Methan als Trägergas Verwendung finden.

¹) WEIGAND verwendet allerdings keinen Elektroneneinfangdetektor, da für N-Trifluoracetat-Peptidester die notwendigen Arbeitstemperaturen über der zulässigen Höchstgrenze von 225° liegen.

Der Phosphordetektor

Der Phosphordetektor wurde erstmals von KARMEN und GIUFFRIDA (5) beschrieben. Diese Autoren benutzten zwei Flammenionisationsdetektoren übereinander, zwischen denen ein mit Alkaliverbindungen belegtes Metallnetz angeordnet war. Letzteres wird durch die untere Flamme stark erhitzt; die dadurch in einer Sauerstoffatmosphäre dauernd auftretende, mit einer Ionisation verbundene Alkaliemission wird durch Halogen und Phosphor verstärkt, d. h. der der Null-emission des Alkali im oberen FID entsprechende Nullionisationsstrom, wird wesentlich größer. Diese Anordnung gestattet also, in Verbindung mit zwei Impedanzwandlern (häufig Ionisationsverstärker genannt) und zwei Kompensationsschreibern, das Eluat einer gaschromatographischen Säule zunächst durch den normalen, unteren FID (für normale C—H-Signale) und dann durch den oberen FID (für die spezifische Anzeige) zu leiten. Diese Anordnung wurde inzwischen modifiziert und zu einem brauchbaren Gerät entwickelt (6).

Die Auswertung der Chromatographie

Die Zeit des Aufenthaltes in der stationären Phase, also der Trennflüssigkeit, ist charakteristisch für die Substanzen und bildet deshalb die Basis für die analytische Auswertung.

Zur *qualitativen* Auswertung der Chromatographie verwendet man die Retentionszeit t_r und das Retentionsvolumen V_r als Maßeinheiten.

Als reduzierte Retentionszeit bezeichnet man die Zeit vom Erscheinen der Inertgasbande (Luftpeak) bis zum Erscheinen des Substanzpeaks, in der nachfolgenden Darstellung die Strecke B—C (Abb. 2). Beim FID tritt kein Luftpeak auf; an seine Stelle kann praktisch der Lösungsmittelpeak treten, wenn man bei hohen Temperaturen arbeitet und niedrig siedende Lösungsmittel verwendet.

Das Retentionsvolumen erhält man durch Multiplikation der Retentionszeit mit der Trägergas-Durchflußmenge (= ml Trägergas pro Minute).

Grundlage für die *quantitative* Auswertung eines Chromatogramms ist die Tatsache, daß die Peakfläche einer Analysenkomponente ein Maß für die Menge darstellt. Da jedoch gleiche Mengen von zwei verschiedenen Substanzen innerhalb gewisser Grenzen in der Regel nicht genau die gleichen Peakflächen ergeben, ist es für genaue Bestimmungen erforderlich, diese Unterschiede durch substanzspezifische Eichfaktoren zu berücksichtigen. In diesem Fall verhalten sich dann die einzelnen Bandenflächen zur Summe aller Flächen wie die Konzentrationen der entsprechenden Analysenkomponenten in der Analysenmischung, vorausgesetzt, daß das Gemisch vollkommen rückstandsfrei verdampft, und alle Bestandteile des Gemisches gaschromatographisch erfaßt werden. Da sich in der Praxis diese Bedingungen oft nicht erfüllen lassen und die Methode im ganzen recht umständlich ist, werden

praktisch folgende Methoden zur quantitativen Auswertung verwendet:

a) Die äußere Eichung der Bandenhöhe. An Stelle der Peakfläche kann die Peakhöhe nur dann zur Auswertung herangezogen werden, wenn die Halbwertsbreite für jede einzelne Substanz konstant bleibt und sich Temperatur, Gasmengenstrom, Druckabfall entlang der Säule, Detektorbedingungen und Trennleistung nicht ändern.

b) Die äußere Eichung der Bandenflächen. Die Methode ist dieselbe wie die oben beschriebene Eichung der Bandenhöhen, nur daß die resultierenden Bandenflächen gegen die aufgegebenen Substanzmengen aufgetragen werden. Es müssen hier jedoch wesentlich weniger Voraussetzungen erfüllt werden. Temperatur, Säulenart und Trennleistung können variieren; nur der Detektor und dessen Betriebsbedingungen sowie der Gasmengenstrom müssen konstant bleiben. Die resultierende Bandenfläche ist der Substanzmenge äquivalent.

c) Eichung mit internem Standard. Es wird eine bekannte Menge einer noch nicht im Gemisch enthaltenen Verbindung zugefügt, aus dem Chromatogramm die Bandenfläche der zugefügten Verbindung ermittelt und mit der Bandenfläche eines interessierenden Stoffes verglichen. Unter Berücksichtigung der Eichfaktoren verhalten sich dann die Bandenflächen wie die Substanzmengen, woraus sich dann die Konzentration des interessierenden Stoffes in der Analysenmischung berechnen läßt.

Man kann auch eine bekannte Menge einer im Gemisch enthaltenen Verbindung zufügen und aus der Vergrößerung der Bandenfläche eine quantitative Aussage machen.

Bedingung für korrekte, quantitative Auswertung ist die Verwendung eines linear anzeigenden Detektors. Zur Ermittlung der Bandenfläche kann man auch einen vollautomatischen elektronischen Integrator benutzen, der das Signal direkt vom Detektor empfängt und das Ergebnis proportional zur Bandenfläche automatisch und digital anzeigt. (Schreiberintegratoren sind weniger genau und erfordern eine zusätzliche Auswertung des Integramms.) Eine solche Arbeitsweise wird aber nur dann von Nutzen sein, wenn große Serien der gleichen Substanz zu analysieren sind. Da der Integrator eine gerade Basislinie erfordert, kann er für die GC der Steroide in biologischem Material des häufigen Lösungsmittel-Tailing wegen vorläufig nicht eingesetzt werden.

Spezielle gaschromatographische Techniken

Die Radio-Gaschromatographie

Durch die Bedeutung der Isotope in der Biochemie und Klinischen Chemie ist die Radio-Gaschromatographie auf großes Interesse gestoßen (7, 8). Das Verfahren kann in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden:

1. das Auffangen der Fraktionen und nachfolgende Messung;

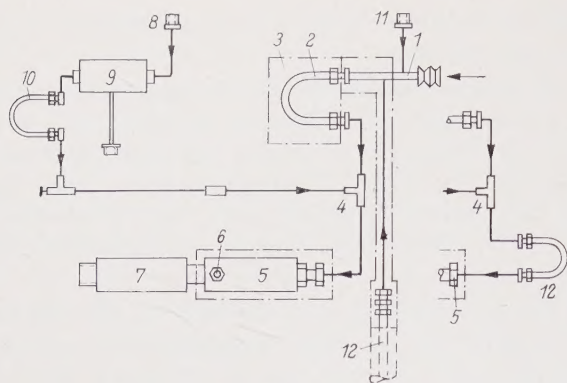


Abb. 3

Detektorsystem für den Nachweis der Radioaktivität

1. Einspritzteil zur Probenaufgabe bei Schnellanalysen zur Messung der Gesamtaktivität; 2. Reaktorsäule, die mit Füllungen zur hydrierenden Crackung oder zum oxidativen Abbau versehen werden kann; 3. Reaktorofen; 4. Zuspiesung von Methan; 5. Proportional-Durchflußzählrohr; 6. Gasaustritt aus Zählrohr; 7. Transistorsondenverstärker; 8. Eintrittsstutzen für Methan; 9. Strömungsregler für konstanten Methanstrom; 10. Filtersäule mit Molekularsiebfüllung zur Nachreinigung des Methanstromes; 11. Eintrittsstutzen für Wasserstoff zur hydrierenden Crackung; 12. Verbindungsrohr zum Gaschromatographen; 13. Trockensäule zur Bindung des Wassers vor dem Zählrohr

2. die gaschromatographische Registrierung der Substanzen und die kontinuierliche und simultane Messung ihrer Radioaktivität.

Beim ersten Verfahren werden die Substanzen einzeln absorbiert, mit der Szintillatorflüssigkeit vermischt und im Szintillationszähler gemessen.

Beim zweiten Verfahren unterscheiden wir zwischen direkt messenden Methoden und solchen, bei denen die Substanzen zunächst in einheitliche Produkte umgewandelt werden.

Für den Nachweis der Radioaktivität können verschiedene Detektorsysteme eingesetzt werden, wie z. B. Ionisationskammern, Durchflußproportionalitätszählrohre und Szintillationsverfahren. Es wird im allgemeinen das Durchflußproportionalitätszählrohr verwendet, das die größte Zählausbeute hat und im Gegensatz zum Szintillationszähler keine Quench-Effekte aufweist.

Zum Nachweis von ^{14}C - und tritiumhaltigen Substanzen wird der Ausgang des Gaschromatographen mit einem Reaktorofen verbunden. Bei der oxidativen Methode wird die organische Verbindung im Reaktorofen mit Hilfe eines Kupferoxid-Katalysators bei $600\text{--}800^\circ$ zu $^{14}\text{CO}_2$ und THO-Wasser oxidiert. Diese Methode eignet sich sehr gut für ^{14}C -haltige Verbindungen, weniger aber für den Nachweis von Tritium. Bei der hydrierenden Crackung (8) werden die tritiumhaltigen Substanzen mit Hilfe eines Zinkoxid-Vanadiumpentoxid-Katalysators im Wasserstoffstrom bei $600\text{--}800^\circ$ zu TH oder CH_3T reduziert. Aus ^{14}C werden Methan oder andere niedere Kohlenwasserstoffe gebildet. Bei manchen sauerstoffhaltigen Verbindungen treten jedoch Aktivitätsverluste auf. Durch das entstehende Tailing wird häufig eine saubere Auswertung der Peaks verhindert. Die ^{14}C -Bestimmung mit Hilfe der hydrierenden Crackung ist daher nicht vollkommen gelöst. Für die Tritium-Bestimmung ist die Methode der hydrierenden Crackung gut geeignet. Nach dem

Reaktor wird Methan als Zählgas zugegeben und das Gasgemisch dem Durchflußzählrohr zur Messung zugeführt. Abbildung 3 zeigt eine schematische Zeichnung einer solchen Apparatur.

Beim direkten Messen der Substanzen ohne vorherige oxydative oder reduzierende Umwandlung zu CO_2 oder Methan treten verschiedene Nachteile auf:

1. „Memory“-Effekte

Unter „Memory“-Effekt versteht man die Restaktivität der vorher im Zählrohr registrierten Verbindung;

2. Löschung

Unterdrückung von Zählrohrimpulsen durch Anlagerung von Sekundärelektronen des radioaktiven Zerfalls an elektronegative Gruppen;

3. Pseudoaktivität

Durch Dämpfe nicht markierter Substanzen werden im Zählrohr Impulse erzeugt, die Radioaktivität vortäuschen oder vorhandene Radioaktivität viel zu hoch erscheinen lassen. Durch Anlegen einer äußeren Strahlenquelle kann geprüft werden, ob eine solche Aktivitätserhöhung durch nicht markierte Substanzen vorliegt.

Da es sich bei biochemischen und klinisch-chemischen Anwendungen meistens um Substanzen handelt, die nur bei hohen Temperaturen verdampft werden können, empfiehlt sich, nach der Gaschromatographie die Substanzen in CO_2 oder Methan umzuwandeln.

Abbildung 4 zeigt das Gaschromatogramm und die synchrone Aufzeichnung der Radioaktivität verschiedener ^{14}C - und tritium-markierter Substanzen.

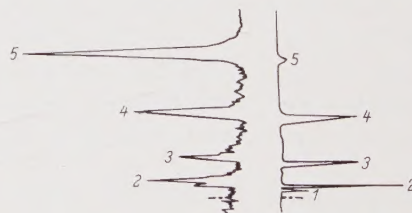


Abb. 4

Gaschromatogramm (rechts) mit synchroner Aufzeichnung der Radioaktivität (links)

Trennung von 5 Komponenten: 1. Äthylacetat $\times 256$ (als Lösungsmittel); 2. Benzoesäure- ^{14}C -methylester $\times 8$; 3. Hexadecan-2-T $\times 32$; 4. Palmitinsäure-1- ^{14}C -methylester $\times 8$; 5. Stearinsäure-9, 10-T-methylester $\times 8$. Die Zahlen hinter den Substanzen geben an, mit welchen Faktoren die Peaks der gaschromatographischen Signale zu multiplizieren sind, um in ihrer Größe vergleichbar zu sein

Die Festkörpereingabe

Eine neuere Variation der GC ist die Festkörpereingabe, bei der die Proben auf einem Schiffchen oder Draht in festem Zustand in den Einspritzblock gebracht werden (9, 10, 11).

Die Methode ist für den Nachweis nur in Spuren vorhandener Verbindungen besonders geeignet. Bei dieser Technik kann häufig auf die Verwendung eines Elektroneneinfangdetektors verzichtet und mit dem störungsfreieren FID gearbeitet werden. Bei der Flüssigprobeneingabe geht ein großer Teil der zu bestimmenden Substanzen verloren, da die Komponenten in mindestens

50–100 μl Lösungsmittel aufgenommen und nicht mehr als 3 μl davon in den Gaschromatographen injiziert werden können. Die Festkörpereingabe gestattet im allgemeinen die Übertragung des gesamten Materials auf die Kolonne, ohne damit eine Überladung zu verursachen. Zusatzgeräte für die Festkörpereingabe sind heute im Handel noch nicht erhältlich; man ist daher auf Eigenkonstruktionen angewiesen.

Die Pyrolyse-Gaschromatographie

Definierte Spaltprodukte unverdampfbarer oder nur schlecht verdampfbarer Substanzen höheren Molekulargewichts können nach zersetzender Destillation auf die Kolonne gebracht werden. Gewisse Struktureinheiten geben nach der Pyrolyse ein konstantes Muster. Sind aromatische oder heterocyclische Ringe in der Verbindung vorhanden, so können reproduzierbare Strukturelemente im Pyrolysat nachgewiesen werden. Die Pyrolyse kann mit Hilfe einer geheizten Platinspirale in einem in den Ofen einführbaren Quarzschiffchen oder mittels schneller Zersetzung durch eine Induktionsheizung (12) durchgeführt werden.

Die präparative Gaschromatographie

Zur zyklisch-automatischen, präparativen GC sind verschiedene Geräte im Handel erhältlich. Die präparative GC automatisiert das gaschromatographische Verfahren, d. h. das Einspritzen und Auffangen der Proben. Steht kein solches Gerät zur Verfügung, so eignet sich vor allem für biochemische und klinisch-chemische Zwecke die präparative GC im Mikromaßstab (Absorptionsmenge von 20–500 μg). Sie kommt in folgenden zwei Fällen zur Anwendung:

1. bei der gaschromatographischen Vorreinigung biologischer Substanzgemische, deren Trennung mit der rein analytischen GC nicht mehr möglich ist.
2. bei der Weiteruntersuchung der gaschromatographischen Peaks mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie, der Infrarot-Spektroskopie, der Massenspektroskopie oder der NMR-Spektroskopie.

Für diese Technik wird ein Gaschromatograph mit Splitter vor dem FID eingesetzt. Abbildung 5 zeigt die schematische Zeichnung eines solchen Gerätes.

Die Peaks werden in einem mit Trockeneis gekühlten Absorptionsrohr von 15 cm Länge und 3 mm innerem Durchmesser aufgefangen.

Über präparative gaschromatographische Trennungen als Hilfsmittel bei klinisch-chemischen Untersuchungen von Zuckern und Steroiden wurde auf dem Internationalen Kongreß für Klinische Chemie 1966 in München berichtet (13).

Die Kombination der Gaschromatographie mit anderen Analysen- und Detektionsverfahren

Im allgemeinen werden die Peaks an Hand der Retentionszeiten den verschiedenen Komponenten zugeordnet. 90% aller gaschromatographischen Analyseergebnisse werden auf diese Art ausgewertet.

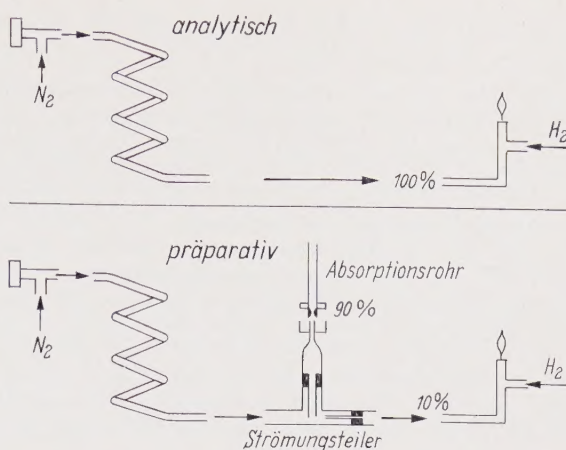


Abb. 5

Schematische Zeichnung eines Gaschromatographen mit (unten) und ohne (oben) Strömungsteiler

In vielen Fällen kann die Identität einer Verbindung noch dadurch sichergestellt werden, daß man mit mehreren Phasen chromatographiert und verschiedene Derivate untersucht. Die Identität einer Verbindung mit einer Vergleichssubstanz kann als gesichert angenommen werden, wenn ihre Retentionszeiten bei den verschiedenen Varianten übereinstimmen. Unbekannte Komponenten eines Gemisches sind jedoch oft nur schwierig eindeutig zu identifizieren. Eine größere Sicherheit bei der Identifizierung erreicht man durch den Einsatz sogenannter selektiver Detektoren, die speziell auf Substanzeigenschaften ansprechen, wie z. B. der thermo-ionische Detektor für Halogen- und Phosphorverbindungen, das Mikrocoulometer für Halogen- und Schwefelverbindungen, der Elektroneneinfangdetektor für elektroneneinfangende Gruppen.

Es besteht die Möglichkeit, die GC mit anderen physikalischen Meßmethoden zu kombinieren. Da uns meistens nur Mikromengen zur Verfügung stehen, sind unsere Kombinationsmöglichkeiten beschränkt; es kommen vor allem die Massenspektroskopie, die Infrarot-Mikrotechnik und die Dünnschichtchromatographie als Kombinationsmöglichkeiten in Betracht. Die Anwendung der NMR-Spektroskopie bleibt auf jene Proben beschränkt, bei denen mit Hilfe der präparativen GC im Mikromaßstab Mengen von wenigstens 500 μg isoliert werden können.

Gaschromatographie/Massenspektroskopie

Die Kombination Gaschromatographie/Massenspektroskopie ist die geeignetste Technik zur Trennung und Analyse unbekannter Gemische aus biologischem Material. Die Massenspektroskopie liefert pro Gewichtseinheit die meisten Informationen, und es gelingt oft, allein an Hand des Massenspektrums eine unbekannte Substanz aufzuklären.

Das einfachfokussierende Massenspektrometer mit magnetischem Sektorfeld ist zu einem betriebssicheren Laboratoriumsinstrument entwickelt worden und hat die breiteste Anwendung gefunden. Die folgenden Ausführungen beschränken sich auf diesen speziellen

Spektrometertyp. Seine Wirkungsweise ist in der folgenden Abbildung skizziert.

In einer unter Vakuum stehenden Ionenquelle werden durch Elektronenbeschuss positiv geladene Ionen der zu untersuchenden Substanz erzeugt. Die geladenen, gasförmigen Teilchen werden gebündelt und durch einen Spalt S_1 in ein Magnetfeld eingeführt. Im Magnetfeld fliegen Ionen der Masse m , die eine Ladung e besitzen, auf Kreisbahnen mit dem Radius $r = \sqrt{2 mU/eB^2}$. Hier findet die sogenannte Massentrennung statt: Bei gleicher Ladung aller Ionen und gegebener Beschleunigungsspannung und Magnetfeldstärke sind die Bahnradialen der Wurzel aus der Ionenmasse proportional. Gleichzeitig werden Ionen gleicher Masse, Ladung und Energie, die den Spalt in verschiedenen Richtungen verlassen, durch das Magnetfeld richtungsfokussiert, d. h. ein Strahl identischer Ionen wird an einem Fokussierungspunkt zusammengeführt. Die Kreiskonstruktion der Ionenbahn ist in

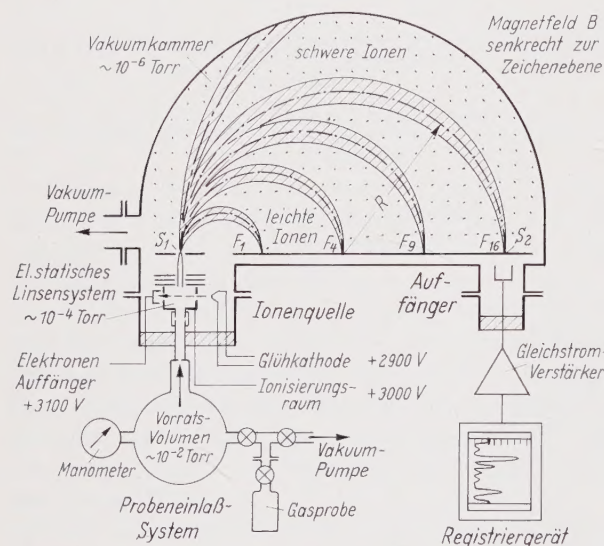


Abb. 6

Einfachfokussierendes Massenspektrometer mit magnetischem 180°-Sektorfeld

R = Radius, S_1 = Ionen Eintrittspalt, S_2 = Ionen Austrittspalt, F_1, F_4, F_9, F_{16} = Fokussierungspunkte

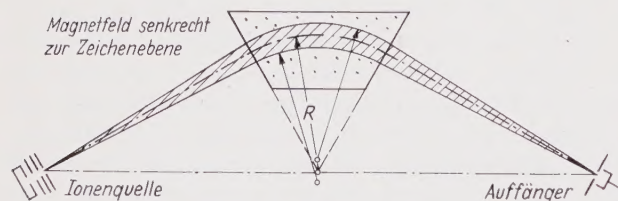


Abb. 7

Richtungs-fokussierung im magnetischen 60°-Sektorfeld

der Darstellung eines 180°-Sektorfeldes (Abb. 6) gut ersichtlich; eine andere gebräuchliche Form ist das 60°-Sektorfeld (Abb. 7). Der Ionennachweis erfolgt direkt am Ort der Fokussierungspunkte durch Registrierung auf eine Photoplate (Massenspektrograph) oder Ladungsabgabe an einen elektrischen Auffänger (Massenspektrometer). Bei einer bestimmten Einstellung des elektrischen und magnetischen Feldes können immer nur Ionen, die gerade zufolge ihrer Masse und Ladung der Gleichung $r = \sqrt{2 mU/eB^2}$ genügen, das Trennrohr bis zu seinem Ende durchheilen. Bei einer kontinuierlichen Änderung des elektrischen oder des magnetischen Feldes erfüllen nacheinander Ionen aller m/e -Werte die in der Gleichung angegebenen Bedingungen und können am Ende des Trennrohres nacheinander ihre Impulse an den Auffänger abgeben. Die anfallende Ionenstromstärke wird fortlaufend registriert, die Folge der Ausschläge ergibt das sogenannte Massenspektrum.

¹⁾ U = Spannung, B = Kraftflußdichte des magnetischen Feldes.

Aus den Massenspektren reiner Substanzen läßt sich durch die Identifizierung des Moleküliions und der Bruchstückionen (nach ihrer Masse) zunächst das Molekulargewicht und (aus der Massenfeinbestimmung) sogar die Bruttoformel ablesen. Die relative Häufigkeit der verschiedenen Ionenarten innerhalb des Massenspektrums liefert Hinweise auf die Struktur des Moleküls.

Isotopenanalyse

Das Isotopenmischungsverhältnis einer Substanz erhält man im Prinzip unmittelbar aus dem Ionenstromverhältnis der isotonen Moleküliionen, da deren „Ionisierungswahrscheinlichkeiten“ gleich groß sind (Identität der Elektronenhülle). Infolge der verschiedenen Masse der Ionen tritt im Massenspektrometer je nach Betriebsbedingungen eine mehr oder weniger große „Massendiskriminierung“ auf (verschiedene Flugbahnen, verschiedene Geschwindigkeiten, verschiedene Feldstärken [U oder B geändert]), d. h. die „Ionen ausbeuten“ können verschieden sein. Eine Absolutbestimmung des Isotopenmischungsverhältnisses ist daher im allgemeinen auf direktem Wege nicht möglich. Man führt stets „Vergleichsmessungen“ aus (synthetischer Standard/unbekannte Probe, Ausgangsmaterial/Reaktionsprodukt, usw.).

Bruchstückionen eignen sich nur schlecht zur Bestimmung von Isotopenhäufigkeiten, da wegen der Massenabhängigkeit der Bindungsenergien die Dissoziationswahrscheinlichkeiten isotoner Bruchstücke verschieden sind (Eichung notwendig). Die Isotopenverteilung in den Moleküliionen kann bei der qualitativen Analyse oft zur Identifizierung der Komponenten dienen.

Zum Nachweis von stabilen Isotopen, wie ^{13}C , ^{15}N und Deuterium, ist die Massenspektroskopie eine wichtige, zukünftige Technik für biochemische und klinisch-chemische Fragestellungen.

Die Kopplung der Gaschromatographie mit der Massenspektroskopie wurde 1957 von HOLMES (14) erstmals beschrieben. Neuere Arbeiten stammen von GOHLKE (15), BEYNON (16), BIEMANN (17) und RYHAGE (18).

Bei dieser Technik kann man die Probe direkt vom Säulenende einer gepackten- oder Kapillarkolonne über einen Separator in das Massenspektrometer überführen. Damit wird die Gefahr der Veränderung der Probe während des Transfers stark vermindert. Ein wesentlicher Teil der Kombination ist der Separator. Er bezweckt, das Verhältnis Trägergas zu Substanz durch Entfernung eines großen Teils des Trägergases günstiger zu gestalten. Wir unterscheiden folgende Separatortypen:

1. BIEMANN-WATSON (Diffusion durch Glasfritte)
2. BECKER-RYHAGE (Düsensystem)
3. Membranseparator VARIAN (Permeabilität einer Membrane)
4. nach LIPSKY (Diffusion durch Teflon)

Der Separator wie auch alle übrigen Verbindungsteile vom Gaschromatographen zum Massenspektrometer müssen geheizt sein, damit die Substanzen nicht kondensieren können. Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung der Gaschromatographie/Massenspektroskopie-Kombination.

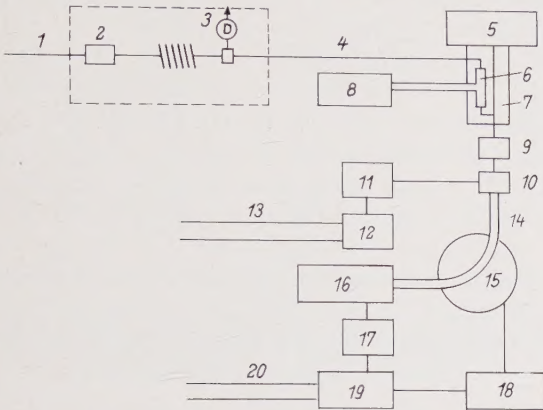


Abb. 8

Kombination von Gaschromatographie und Massenspektroskopie
1. Trägergas; 2. Einspritzblock; 3. Gaschromatograph; 4. geheizte Verbindungsleitung; 5. Einlaßteil; 6. WATSON-BIEMANN Helium Separator; 7. Ofen; 8. Rotationspumpe; 9. Ionenquelle; 10. Total-Ionenstrom-Monitor; 11. Verstärker; 12. Papierschreiber; 13. Gaschromatogramm; 14. Analysator; 15. Magnet; 16. Sekundär-Elektronen-Vervielfacher (SEV); 17. Verstärker; 18. schneller Massendurchlauf; 19. Galvanometer-Schreiber; 20. Massenspektrum

Man nimmt aus der Ionenquelle ein Aliquot des Total-Ionenstromes, der durch einen Photomultiplier verstärkt und durch einen Schreiber registriert wird. Dies ist das eigentliche Gaschromatogramm.

Da für ein Massenspektrum nur 1 bis 5 Sekunden benötigt werden, kann man unter Umständen von jedem Peak mehrere Massenspektren aufnehmen.

Die notwendige Substanzmenge für die Gaschromatographie/Massenspektroskopie-Kombination ist sehr gering und beträgt je nach Auflösung etwa 1–1000 ng. Diese Kombination ist die ideale Nachweismethode für stabile Isotopen wie ^{13}C , ^{15}N und Deuterium.

Die Proben können auch mit präparativer GC aufgefangen und in das Direkt-Einlaßsystem eines Massenspektrometers eingeführt werden. Bei dieser Technik werden aber meistens 10 μg benötigt.

Gaschromatographie/Infrarot-Spektroskopie

Die GC kann direkt oder indirekt mit der Infrarot-Spektroskopie kombiniert werden. Die Infrarot-Spektroskopie dient dem Identitätsbeweis von Verbindungen und in Ergänzung zur Massenspektroskopie und NMR-Spektroskopie der Strukturaufklärung unbekannter Substanzen.

Für die GC bedient man sich der Infrarot-Spektroskopie im Ultramikromaßstab. Zu diesem Zweck eignet sich ein Gitterspektrometer mit Beam Condensor. Man verwendet KBr-Mikropreßlinge von 0,5–1,5 mm $\varnothing$ oder Mikro-NaCl-Küvetten von 2 μl Inhalt.

Die KBr-Preßlinge werden in einem speziellen Mikropreßwerkzeug hergestellt. Die Pille wird zunächst schwach vorgepreßt und die Substanz mit einer Hamilton-Mikrospritze in Methylenchlorid oder einem anderen Lösungsmittel aufgetropft. Nach 5minütigem Trocknen im Wärmeschrank wird die Pille anschließend gepreßt.

Die Substanzen werden zunächst mittels präparativer GC in einem Kapillarrohr absorbiert und im Fall von Trimethylsilyläthern mit Methanol/Salzsäure gespalten. Zur Reinigung von eluiertem Kolonnenmaterial und abgespaltenem Siloxan wird die Substanz an einer Mikro-Aluminiumoxidkolonne gereinigt und anschließend auf den Mikropreßling aufgetragen. Mit dieser Technik können noch Infrarot-Spektren von 2–5 μg Substanz aufgenommen werden.

Über die Methode wurde auf dem Internationalen Kongreß für Klinische Chemie 1966 in München berichtet (13). Sie konnte zur Identifizierung von gaschromatographisch vorgetrennten Steroiden in biologischem Material erfolgreich angewandt werden.

Die GC kann auch direkt mit einer geheizten Infrarot-Glasdurchflußküvette kombiniert werden. Für biochemische und medizinisch-chemische Zwecke ist eine solche Kombination aus folgenden Gründen nicht geeignet:

1. Die entstehenden Gasspektren unterscheiden sich von den normalen Spektren.
2. Während des Durchgangs des gaschromatographischen Peaks ändern sich die relativen Intensitäten des Infrarot-Spektrums.
3. Geringe Empfindlichkeit.
4. Der kurzen Registrierzeit wegen ist die Genauigkeit gering; für eine solche Kombination sind daher nur Filtergeräte mit geringer Auflösung im Handel erhältlich.
5. Die zu untersuchenden Verbindungen werden nur sehr selten als solche, im allgemeinen in Form ihrer Derivate, gaschromatographiert. Bei Steroiden und Kohlenhydraten verwendet man Trimethylsilyläther, die aber keine sehr charakteristischen Infrarot-Spektren aufweisen. Zudem werden die Spektren von eluiertem Kolonnenmaterial überlagert.

Gaschromatographie/NMR-Spektroskopie

Die Anwendung der Kernmagnetischen Resonanz (NMR, von nuclear magnetic resonance) hat seit den ersten Experimenten, die im Jahr 1946 gleichzeitig von BLOCH (19) und PURCELL (20) durchgeführt wurden, einen ungeheuren Aufschwung erfahren.

Bei diesem Verfahren werden meistens flüssig-gelöste oder gasförmige, organische Verbindungen in speziellen Apparaten einem magnetischen Feld von hoher Feldstärke und gleichzeitig einem Hochfrequenzfeld (Radiofrequenz) ausgesetzt, wobei man auf Grund solcher Resonanzexperimente NMR-Spektren erhält, die für Struktur- und Konformationsanalysen von Bedeutung sind. Charakteristische Parameter sind chemische Verschiebung und Kopplungskonstante, deren Beträge sehr empfindlich auf Strukturveränderungen ansprechen. Die Interpretation der Spektren ist oft einfacher und eindeutiger als diejenige der IR- und UV-Resultate. Die so nachweisbaren Atomkerne enthalten magnetische Kerne, wie ^1H , ^{19}F , ^{31}P , ^{14}N , ^{15}N , ^{17}O usw.

Das Hauptanwendungsgebiet liegt auf den Protonenresonanzen. Diese Messungen geben viele wertvolle Informationen, da die Positionen der Signale (chemische Verschiebung) auch von der Art der Elektronenzustände um den betreffenden Kern abhängig sind. Es ist eine Vereinfachung der Spektralanalyse durch Doppelresonanz-Experimente möglich (Mehrfachresonanz). Dank der Nichterfüllung des FRANK-CONDON-Prinzips, im Gegensatz zur IR- und UV-Spektroskopie, können Rotations- und Austauschgeschwindigkeiten in Molekülen bestimmt werden (wichtig für gewisse Untersuchungen von Milieuinteraktionen). Die hochauflösende Kernresonanz-Spektroskopie ist auf Flüssigkeiten oder Lösungen geringer Viskosität beschränkt. Als Lösungsmittel sollten Verbindungen gewählt werden, die chemisch inert sind. Für die Protonenresonanz kommen vor allem Tetrachlorkohlenstoff, deuteriertes Dimethylsulfoxid, Aceton, Chloroform und Schwefelkohlenstoff in Frage. Es ist aber ein wesentlicher Vorteil, daß im Prinzip alle Lösungsmittel verwendbar sind und ein großer Temperaturbereich besteht. Zur Aufnahme der Spektren werden die Substanzen in dünne Glasröhrchen von 0,4 ml Inhalt eingefüllt. In die Flüssigkeit oder Lösung wird eine kleine Menge einer Bezugssubstanz gegeben. Bei den Protonen-Resonanzen verwendet man vorteilhaft Tetramethylsilan.

Um die Empfindlichkeit zu steigern, kann man die Flüssigkeitsmenge in ein Mikromeßröhrchen einfüllen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, ein Spektrum mehrmals aufzunehmen und die einzelnen Meßdaten elektronisch zu speichern. Bei diesem „Cat-Verfahren“ (nach computer of average transitions) läßt sich durch 100maliges Aufnehmen das Signal/Rausch-Verhältnis um einen Faktor 10 verbessern. Auf diese Weise können noch Spektren mit etwa 500 µg aufgenommen werden. Die direkte Kopplung der Gaschromatographie mit der NMR-Spektroskopie ist nur beschränkt möglich. Für NMR-Spektren werden heute im günstigsten Fall immer noch 500 µg Substanz benötigt. Die NMR-Spektroskopie kann daher in Verbindung mit der GC nur dort Verwendung finden, wo es gelingt, mit präparativer GC wenigstens 500 µg Substanz zu absorbieren.

Gaschromatographie/Dünnschichtchromatographie

Die Kopplung der Gaschromatographie mit der Dünnschichtchromatographie ist eine leistungsfähige und kostensparende Trennmethode, die daher auch in kleineren bis mittleren Laboratorien Anwendung finden

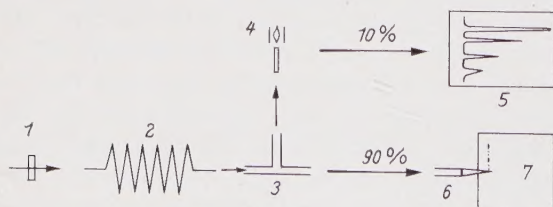


Abb. 9

Prinzip der Kombination GC/DC

1. Einlaß-System; 2. Trennsäule; 3. Strömungssplitter; 4. Flammonisationsdetektor; 5. Registriergerät; 6. Adsorptionsrohr; 7. Dünnschichtplatte

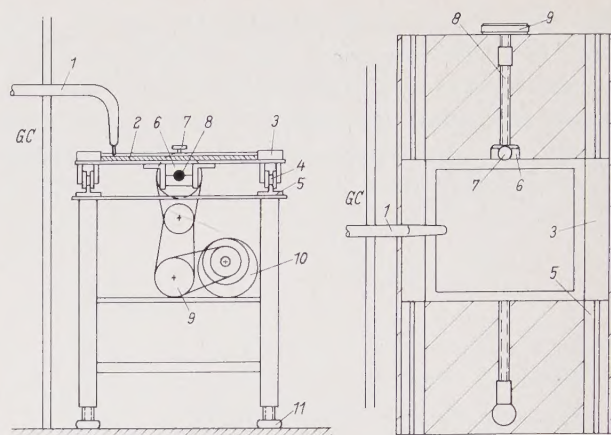


Abb. 10

Kopplung von Dünnschichtchromatographie mit dem Gaschromatographen

a) Seitenansicht, b) Draufsicht des Platten-Transportwagens: 1. geheiztes Adsorptionsrohr; 2. Dünnschichtplatte; 3. Plattenträger; 4. Räder; 5. T-Schiene; 6. Kupplung; 7. Entkopplungsknopf; 8. Spindel; 9. Getriebe; 10. Motor; 11. Niveauschraube

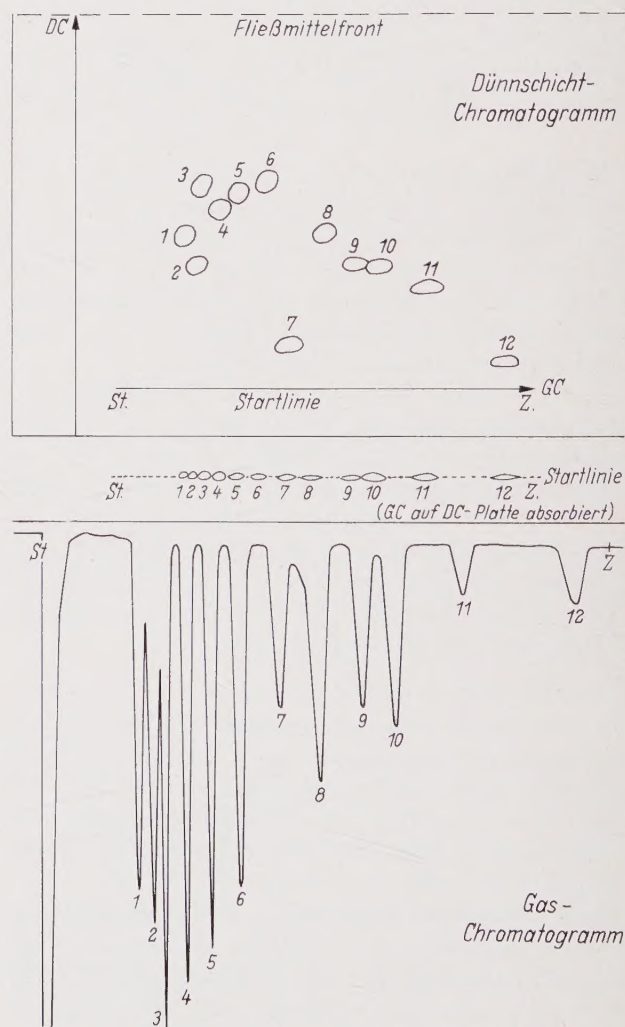


Abb. 11

Dünnschichtchromatogramm und Gaschromatogramm von 12 Steroiden

1. Allo-Pregnandiol; 2. Pregnandiol; 3. Androsteron; 4. Etiocholanolon; 5. Dehydroepiandrosteron; 6. Pregnanolon; 7. Pregnatriol; 8. 11-Keto-Androsteron; 9. 11-Keto-Etiocholanolon; 10. 11-Hydroxy-Androsteron; 11. 11-Hydroxy-Etiocholanolon; 12. Pregnatriolol

kann. Bei diskontinuierlicher Kopplung werden die Substanzen zunächst mit präparativer GC isoliert und anschließend als Derivate oder in ihrer freien Form dünn-schichtchromatographiert.

Eine automatische Kopplung der Dünnschichtplatte mit einem Gaschromatographen wurde von zwei Arbeitsgruppen beschrieben (21, 22). Diese Methode wurde auch speziell für die Analyse von Steroiden ausgearbeitet (22). Das Prinzip einer solchen Kombination ist in Abbildung 9 dargestellt.

Eine mit Kieselgel G beschichtete Dünnschichtplatte von 20×20 cm wird an den Ausgang der gaschromatographischen Trennsäule angeschlossen. Die Platte wird mit Hilfe eines Motors auf einem Wagen fortbewegt; die aus der Trennsäule austretenden Substanzen können somit auf der Startlinie nacheinander adsorbiert werden. Ein am Ende der Trennsäule eingebauter Splitter trennt den Gasstrom in zwei Teile. Nur etwa 10% werden dem FID zugeführt. Vom zweiten Ausgang des Splitters werden 90% des Gasstromes durch eine dünne Metallkapillare von 1,5 mm $\varnothing$ bis 0,5–1 mm über die Dünnschichtplatte geführt. Die Kapillare wird vom geheizten Detektorofen bis über die Platte durch ein Silberrohr von 4,0/2,2 mm $\varnothing$ geleitet, das seinerseits von der ungeheizten Seite außerhalb des Gaschromatographen an mit Asbest und Aluminiumfolie gegen Wärmeverlust isoliert ist.

Der Wagen wird mit Hilfe eines kleinen Elektromotors über ein Getriebe fortbewegt (Abb. 10). Das Getriebe kann entweder stufenlos sein oder sich auf einige vorwählbare Geschwindigkeiten einstellen lassen. Die gaschromatographisch getrennten Substanzen werden so nacheinander auf der Startlinie der Dünnschichtplatte adsorbiert.

Die Steroide lassen sich am vorteilhaftesten als Trimethylsilyläther-Derivate gaschromatographieren. Die Trimethylsilyläther sind nicht so hydrolyseempfindlich, wie dies allgemein angenommen wird, sie können sogar unzersetzt dünn-schichtchromatographiert werden; ihre dünn-schichtchromatographische Trennung ist jedoch unbefriedigend.

Es erweist sich daher als günstig, die Trimethylsilyläther mit Methanol-Salzsäure auf der Startlinie in ihre Komponenten aufzuspalten und die freigesetzten Steroide in einem geeigneten Fließmittelsystem dünn-schichtchromatographisch zu entwickeln. Es kann hier die ganze Vielfalt der dünn-schichtchromatographischen Trennmedien eingesetzt werden. Beim Besprühen der Dünnschichtplatte mit einem Farbreagenz kommt ein weiterer Vorteil der GC/DC-Kopplung zur Geltung: Die verwendete Farbreaktion kann chemisch hochspezifisch sein. In Abbildung 11 sind die Resultate einer solchen automatischen GC/DC-Kopplung dargestellt.

Literatur

1. HARLEY, J., W. NEL und V. PRETORIUS, *Nature* (London) **181**, 177 (1958). — McWILLIAM, J. G. und R. A. DEWAR, *Gas Chromatography* S. 142. Ed. by D. H. Destry, Butterworths Sci. Publ. London (1958). — 2. LOVELOCK, J. E. und S. R. LIPSKY, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 431 (1960). — 3. CLARK, S. J. und H. H. WOTIZ, *Steroids* **2**, 535 (1963). — 4. WEIGAND, F. R., B. KOLB, A. PROX, M. A. TILAK und J. TOMIDA, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* **322**, 38 (1960). — 5. KARMEN, A. und L. GIUFFRIDA, *Nature* (London) **201**, 1204 (1964). — 6. JENTZSCH, D., H. G. ZIMMERMANN und I. WEHLING, *Z. analyt. Chem.* **221**, 377 (1966). — 7. DRAWERT, F. und O. BACHMANN, *Angew. Chem.* **75**, 717 (1963). — 8. SIMON, H., G. MÜLLHOFFER und R. MEDINA, *Radioisotope Sample Measurement Techniques in Medicine and Biology*. S. 317. International Atomic Energy Agency, Vienna (1965). — 9. BOWMAN, R. L. und A. KARMON, *Nature* (London) **182**, 1233 (1958). — 10. MENINI, E. und J. K. NORZYMSKI, *Biochem. J.* **95**, 1 (1965). — 11. LURIE, A. O. und C. A. VILLEE, *J. Gas Chromat.* **4**, 160 (1966). — 12. VÖLLMIN, J., P. KRIEMLER, I. OMURA, J. SEIBL und W. SIMON, *Microchem. J.* **11**, 73 (1966). — 13. CURTIUS, H.-CH., *Enzymol. biol. clin.* **6**, Suppl., 199 (1966). — 14. HOLMES, J. C. und F. A. MORELL, *Appl. Spectrosc.* **11**, 86 (1957). — 15. GOHLKE, R. S., *Analytic. Chem.* **31**, 535 (1959). — 16. BEYNON, J. H., R. A. SAUNDERS und A. E. WILLIAMS, *J. sci. Instruments* **36**, 375 (1959). — 17. BIEMANN, K. und J. T. WATSON, *Analytic. Chem.* **36**, 1135 (1964). — 18. RYHAGE, R., *Analytic. Chem.* **36**, 959 (1964). — 19. BLOCH, F., W. W. HANSEN und M. E. PACKARD, *Physic. Rev.* **69**, 127 (1946) und **70**, 460, 474 (1946). — 20. PURCELL, E. M., H. C. TORREY und R. V. POUND, *Physic. Rev.* **69**, 37 (1946). — 21. KAISER, R., *Hochschultaschenbuch Chromatographie in der Gasphase. IV. Quantitative Auswertung Bibliograph. Institut AG, Mannheim* (1965). — 22. CURTIUS, H.-CH. und M. MÜLLER, *J. Chromat.* **32**, 222 (1968).

Dr. H.-Ch. Curtius
CH 8032 Zürich
Steinwiesstr. 75

